

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年12月21日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77048 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 14/745, 17/14 (74) 代理人: 八田幹雄, 外(HATTA, Mikio et al.) ; 〒102-0084 東京都千代田区二番町11番地9 ダイアパレス二番町 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03863
- (22) 国際出願日: 2000年6月14日 (14.06.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/167453 1999年6月14日 (14.06.1999) JP
特願2000/62629 2000年3月7日 (07.03.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤森工業株式会社 (FUJIMORI KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0002 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番16号 Tokyo (JP). チッソ株式会社 (CHISSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島三丁目6番32号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 細川和也 (HOSOKAWA, Kazuya) [JP/JP]; 〒211-0002 神奈川県川崎市中原区上丸子山王町1547-1 Kanagawa (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUBSTANCE BINDING TO THE SUBSTRATE OF ACTIVATED BLOOD COAGULATION FACTOR IN COMPETITION WITH THIS FACTOR TO THEREBY REGULATE THE REACTION BETWEEN THE ACTIVATED BLOOD COAGULATION FACTOR AND THE SUBSTRATE, A PROCESS FOR PRODUCING THE SUBSTANCE AND BLOOD COAGULATION FACTOR-ADSORBENT WITH THE USE OF THE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質、該物質の製造方法、および該物質を用いた血液凝固因子吸着体

(57) Abstract: A substance capable of selectively inhibiting a target enzyme activity alone; and a blood coagulation factor-adsorbent with the use of this substance. Namely, a substance which binds to the substrate of an activated blood coagulation factor in competition with the blood coagulation factor to thereby regulate the reaction between the blood coagulation factor and the substrate.

[続葉有]

WO 00/77048 A1



(57) 要約:

本発明は、目的とする酵素活性のみを選択的に阻害することが可能な物質、および該物質を用いた血液凝固因子吸着体を提供する。すなわち、本発明は、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質、および該物質を用いた血液凝固因子吸着体により達成されるものである。

明 細 書

活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質、該物質の製造方法、および該物質を用いた血液凝固因子吸着体

技術分野

本発明は、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質、該物質の製造方法、および該物質を用いた血液凝固因子吸着体に関する。

背景技術

播種性血管内凝固症候群（DIC）をはじめとする血栓症の治療および予防においては、抗血小板薬や抗凝固薬などの数多くの血栓形成予防薬が用いられている。

抗凝固薬のうち有効な血栓形成予防薬として、従来から、活性化血液凝固第II因子、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、および活性化血液凝固第X因子などのセリンプロテアーゼ活性を阻害するセリンプロテアーゼ抑制剤が使用されており、該セリンプロテアーゼ抑制剤は、セリンプロテアーゼの活性領域に結合することによってセリンプロテアーゼの活性を抑制するものであった。

しかしながら、セリンプロテアーゼ抑制剤をはじめとする、従来の活性化血液凝固因子阻害剤は、数種の活性化血液凝固因子が活性領域において類似した構造を持つことから、目的とする活性化血液凝固因子の酵素活性のみを選択的に阻害することは困難であった。

また、上記血栓形成予防薬の作用機構は様々であるが、活性化血液凝

固因子と構造が酷似し、該活性化血液凝固因子の基質と、該活性化血液凝固因子と競争して結合し、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を阻害することによって、血管内における血栓形成を予防し得る物質は開発されていなかった。

5

発明の開示

本発明の第 1 の目的は、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質、およびその製造方法を提供するものである。

10

該物質の利用は、実質的に活性化血液凝固因子の活性を抑制でき、新機構の血栓形成予防薬として極めて有用であるだけでなく、発酵工業や、その他有用蛋白精製工程などの分野における酵素活性の制御において、有効に使用することができる。

15

本発明の第 2 の目的は、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質を、リガンドとして担体に固定した血液凝固因子吸着体を提供することである。

従来、該物質をリガンドとして担体に固定した血液凝固因子の吸着体、並びに、該吸着体を用いた血液凝固因子の精製方法は開発されていなかった。

20

本発明の第 3 の目的は、フィブリノーゲンや、異種タンパク質などの混入の可能性が極めて低い血液凝固因子の精製方法を提供することである。

25

本発明者は、前述の従来技術の問題点に鑑み鋭意研究を重ねた結果、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質を血栓形成予防薬などに代表される酵素活性抑制剤として使用すれば

、目的とする酵素活性のみを選択的に阻害することが可能であることを
見だし、更に、該物質をリガンドとして担体に固定した血液凝固因子
吸着体を用いて血液凝固因子の精製を行えば、フィブリノーゲンや、異
種タンパク質などの混入を顕著に押さえることが可能であることを知見
し、この知見に基づいて本発明を完成させた。

本発明は下記の（１）～（１１）の構成からなる。

（１） 活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争
して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を
抑制する物質。

（２） 前記物質が、活性化血液凝固因子の１もしくは数個のアミノ
酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる物質である前
記（１）に記載の物質。

（３） 前記物質が、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の
活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質である前記（１）または
（２）に記載の物質。

（４） 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液
凝固第X因子である前記（３）に記載の物質。

（５） 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液
凝固第IX因子である前記（３）に記載の物質。

（６） 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液
凝固第VII因子である前記（３）に記載の物質。

（７） １．活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリ
ン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程、

２．pH11.0～13.5の範囲でアルカリ処理を行う工程、

３．回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程にお
いて、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた１種以上の化
合物と、塩若しくは両性電解質を共存させることを特徴とする前記（１）
～（６）のいずれか１項に記載の物質の製造方法。

(8) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載の物質を担体に固定した血液凝固因子吸着体。

(9) 前記担体が、粒子である前記(8)に記載の血液凝固因子吸着体。

5 (10) 前記担体が、セルロースである前記(8)または(9)に記載の血液凝固因子吸着体。

(11) 前記(8)～(10)のいずれか1項に記載の血液凝固因子吸着体を使用することを特徴とする血液凝固因子の精製方法。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

第1の発明である、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質は、酵素活性を示さない物質であることが好ましく、また、該物質は該活性化血液凝固因子の基質に類似した構造であることが好ましい。

15 活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質は、特に限定されるものではないが、具体的には、活性化血液凝固因子の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる物質や、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質を挙げることができる。

25 活性化血液凝固因子の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる物質としては、活性化血液凝固因子活性部位中のアスパラギン酸をアスパラギンに置換したものや、活性化血液凝固因子活性部位中の活性セリンをアラニンに置換したものを挙げることができる。

本発明において、活性化血液凝固因子は活性化血液凝固因子の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる物質において、活性化血液凝固因子が、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、または活性化血液凝固第X因子であれば、
5 該物質は顕著な血栓形成予防効果を有することから、本発明において活性化血液凝固因子は、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、または活性化血液凝固第X因子であることが好ましい。

活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質とは、活性化血液凝固因子の活性中心である活
10 性セリン残基を、デヒドロアラニンと置換したものである。

本発明においては、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子についても特に限定されるものではないが、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質において、
15 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、または活性化血液凝固第X因子であれば、該物質は顕著な血栓形成予防効果を有することから、本発明において活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子は、活性化血液凝固第VII因子、活性化血液凝固第IX因子、または活性化血液凝固第X因子であることが好ましい。

20 原料である活性化血液凝固因子、並びに活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子は、何れの方法で得られたものであっても構わないが、具体的には、血漿より精製後活性化されたものであっても、遺伝子組換え操作によって得られたものであっても、本発明に使用することができる。

25 本発明の活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質（以下「アンヒドロ化凝固因子」とも記述する。）の製造方法は特に限定されるものではないが、具体的には活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基を、化学合成的手法によりデヒドロアラニンに換える方法を挙げることができる

。

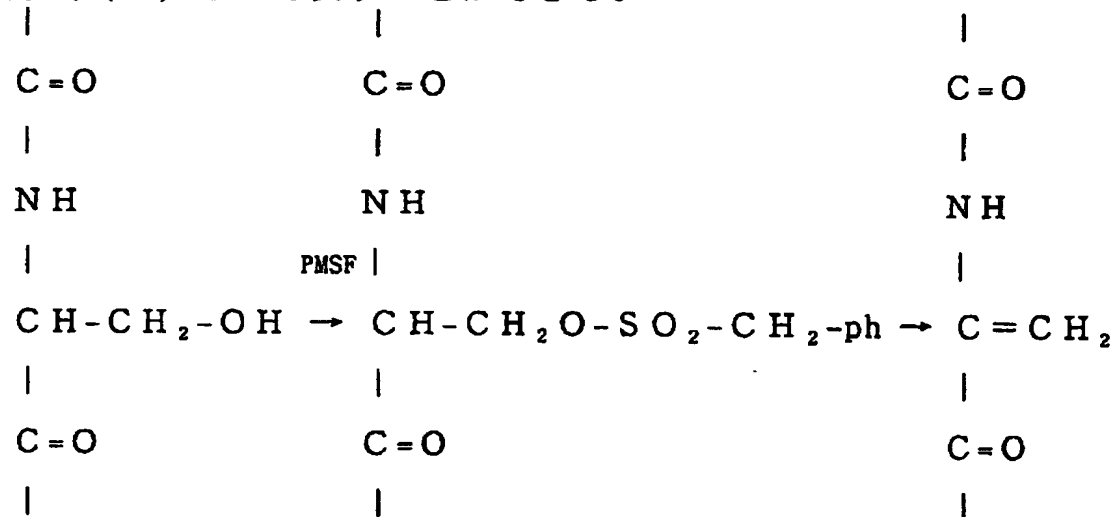
本発明においては、下記第 1 ～ 第 3 の工程、

活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程（第 1 工程）、

5 p H 11.0 ～ 13.5 の範囲でアルカリ処理を行う工程（第 2 工程）、
 回収を行う工程（第 3 工程）、

を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた 1 種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させる方法であることが好ましい。

10 該製造方法について、合成阻害剤としてフェニルメタンスルホニルフルオリド（P M S F）を使用した場合を例にとって説明すれば、下記反応式（1）として表すことができる。



活性化血液凝固因子のセリン残基

PMS-活性化血液凝固因子

アンヒドロ化凝固因子

反応式（1）

15 以下、本発明のアンヒドロ化凝固因子の製造方法を、上記第 1 ～ 第 3 の工程に沿って説明する。

尚、本発明の製造方法は、第 1 ～ 第 3 工程のすべての工程において多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた 1 種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させるものであり、少なくとも回収操作を

行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させることが好ましい。

(1) 第1工程

第1工程は、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性を失わせる目的で、該活性化血液凝固因子の活性セリン残基結合部位と合成阻害剤とをエステル結合させる工程であり、該活性化血液凝固因子の活性セリン残基結合部位と合成阻害剤とを反応させる工程と、該反応によって生成した生成物を精製分離する工程からなる。

本発明の製造方法に使用することができる合成阻害剤としては、前述のように、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基と反応してエステル結合を形成するものであれば、特に制限されるものではないが、具体的には、PMSF、2-フェニルエタン-1-スルホニルフルオリド、メタンスルホニルフルオリド、およびp-トルエンスルホニル(トシル)フルオリドなどの各種スルホニルフルオリド、更に、トシルクロリド、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)、3,4-ジクロロイソクマリン(3,4-DCI)、L-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸(TLCK)、およびL-1-クロロ-3-[4-トシルアシド]-4-フェニル-2-ヘプタノン(TPCK)などを挙げることができる。

前述の合成阻害剤を、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子と反応させる場合、該合成阻害剤はそのまま使用してもよく、また、予め該合成阻害剤を、メタノール、アセトン、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、プロパン-2-オール、ジメチルホルムアルデヒド、およびジメチルスルホキシドなどの溶媒に溶解させたものを使用してもよい。

合成阻害剤を過剰に添加した場合には、その後、分離除去操作が必要となることから、合成阻害剤の添加は、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性を確認しながら、好ましくは該活性が3%以下、よ

り好ましくは 1 % 以下になるまで確認しながら行うことが好ましい。

第 1 工程に使用する反応溶媒は、塩化ナトリウムを含む緩衝液、或いは、該塩類溶液に更にカリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンなど数種類のイオンを加えた緩衝液であって、緩衝系として p H 2 ~ 1 0 の範囲のものであることが好ましく、より好ましくは p H 4 ~ 8 の範囲のものである。

該緩衝液として具体的には、リン酸緩衝液、炭酸塩緩衝液、重炭酸塩緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸ーリン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸ー水酸化ナトリウム緩衝液、フタル酸カリウムー水酸化ナトリウム緩衝液、イミダゾールー塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、生理的塩類溶液、およびグットの緩衝液であって、緩衝系として p H が 2 ~ 1 0 の範囲となるように調整されたものを挙げることができる。

第 1 工程における反応温度は、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の安定性に影響しない範囲であれば特に限定されるものではないが、本発明においては、 $-30 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の範囲であることが好ましく、より好ましくは $4 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の範囲である。

該活性化血液凝固因子の活性セリン残基結合部位と合成阻害剤とを反応させる工程によって得られた生成物は、公知の方法を用いて分離精製することができる。

分離精製に用いる方法は、特に制限されるものではなく、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過膜、および透析などの方法を挙げることができる。

ゲル濾過によって該生成物の精製を行う場合を例にとりて、該分離精製について説明する。反応に使用した溶媒で膨潤させたゲル（例えば、セファデックス、バイオゲル、アガロースゲルなどを挙げることができる。）粒子を充填したカラムに、該活性化血液凝固因子の活性セリン残基結合部位と合成阻害剤との反応液を添加し、次いで該溶媒を該カラムに流し続けることにより、先ず、高分子溶質の生成物、遅れて低分子溶質である合成阻害剤が流出することによって、該生成物と過剰の合成阻

害剤とが分離される。

(2) 第2工程

第2工程は、第1工程で得られた生成物から合成阻害剤を解離させるとともに、セリン残基をデヒドロアラニンに変え、アンヒドロ化凝固因子とする工程であり、操作としては、該生成物に対しpH11.0~13.5の範囲でアルカリ処理を行う工程である。

第2工程では、第1工程で得られた生成物に直接アルカリ液を加え、pHを11.0~13.5の範囲とした生成物溶液を調整してもよく、また、予め該生成物を溶媒に溶解させた溶液に、アルカリ液もしくはアルカリ物質を加え、pHを11.0~13.5の範囲とした生成物溶液を調整してもよい。

該溶媒としては、前述の第1工程において反応溶媒として用いた緩衝液を使用することができる。

以上のようにして調整された生成物溶液は、温度を-30~50℃、好ましくは4~40℃の範囲で一定時間保持する。

本発明の第2工程において、pHが11.0を下回る場合には、該生成物からの合成阻害剤の解離、およびセリン残基のデヒドロアラニンへの移行速度が極端に遅くなる。

また、第2工程における生成物溶液の温度が-30℃を下回る場合には、該生成物溶液自体が凍結する可能性があり、一方、50℃を上回る場合には、該生成物および／または該生成物から合成阻害剤が解離した物質（アンヒドロ化凝固因子）が蛋白変性を受ける場合がある。

(3) 第3工程

第3工程は、第2工程で得られたアンヒドロ化凝固因子に対し、多価アルコールおよび糖類より選ばれてなる少なくとも1種の化合物と、塩若しくは両性電解質の共存下で再生操作を行う工程と、再生されたアンヒドロ化凝固因子を分離精製する工程からなる。

再生操作により、アンヒドロ化凝固因子の立体構造を、元の活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子と同じ立体構造にすることができる

。

該再生操作は特に限定されるものではなく、公知の方法を使用することができる。例えば、第2工程終了後の生成物溶液のpHを、前述の第1工程において反応溶媒として用いた緩衝液を使用して、4～10の範囲に調整し、
5 -30～50℃の温度範囲で一定時間保持する方法や、透析によりpHを4～10の範囲に調整する方法などを挙げることができる。

次いで、反応系に共存させた多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物、更に除去する必要のある塩あるいは両性電解質（NaClやリン酸塩類等の塩あるいは両性電解質の1種が、最終的なアンヒドロ化凝固因子の抽出操作に用いる溶出液に含まれていてもよいような場合には、あえて分離除去する必要のないこともある）、およびその他の不純物を除去し、再生されたアンヒドロ化凝固因子の精製分離を行う。

多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物、更に除去する必要のある塩あるいは両性電解質の精製分離方法としては、特に制限されるものでなく、従来公知の方法を利用することができる。例えば、透析、限外濾過、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどを利用
20 することができる。

代表的な透析操作では、再生したアンヒドロ化凝固因子の溶液から多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物を、セルロースなどの膜を介してpH4～10の溶媒に透過させる。

25 その他不純物の精製分離方法としては、特に制限されるものでなく、従来公知の精製分離方法を利用することができる。

例えば、再生されたアンヒドロ化凝固因子を含む溶液を、YM10メンブランなどを用いて濃縮し、次に、pH4～10の溶媒（前述の第1工程において反応溶媒として用いた緩衝液を使用することができる。）

で平衡化したベンザミジンセファロースカラム等に通液して洗浄し、さらに pH 4 ~ 10 に調整されたベンザミジン溶液（該ベンザミジン溶液には、目的蛋白を特異的吸着させる目的で塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムなどの塩類が含まれていてもよい。）で溶出し、次いで、ベンザミジンを除去する目的で pH 4 ~ 10 の溶媒（前述の第 1 工程において反応溶媒として用いた緩衝液を使用することができる。）で透析して再生されたアンヒドロ化凝固因子を抽出する方法や、限外濾過による分離やセファデックスカラムによるゲル濾過等の方法などを挙げることができる。

第 1 ~ 第 3 工程のすべての工程において、若しくは少なくとも回収操作を行う第 3 工程において、共存させる多価アルコール（糖アルコールを含む）としては、テトリトール（具体的には、エリトリトール、D - スレイトール、L - スレイトール、および D, L - スレイトールなどを挙げることができる）、ペンチトール（具体的には、リビトール、D - アラビニトール、L - アラビニトール、D, L - アラビニトール、およびキシリトールなどを挙げることができる。）、ヘキシトール（具体的には、アリトール、ダルシトール（ガラクトース）、ソルビトール（D - グルシトール）、L - グルシトール、D, L - グルシトール、D - マンニトール、L - マンニトール、D, L - マンニトール、D - アルトリトール、L - アルトリトール、D, L - アルトリトール、D - イジトール、および L - イジトールなどを挙げることができる。）、ヘプチトール、マルチトール、ラクチトール、グリセリン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1, 3 - ブチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ペンタメチレングリコール、ヘキサメチレングリコール、ペンタエリトリトール、ジペンタエリトリトール、トリペンタエリトリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、無水エンネアヘプチトール、1, 4 - ブタンジオール、1, 2, 4 - ブタントリオール、および 1, 2, 6 - ヘキサントリオールなどを挙げるこ

とができる。

第1～第3工程のすべての工程において、若しくは少なくとも回収操作を行う第3工程において、共存させる糖類としては、グリセリンアルデヒドジオキシアセトン、トレオース、エリトルロース、エリトロース、アラビノース、リブロース、リボース、キシロース、キシルロース、リキソース、グルコース、フルクトース、マンノース、イドース、ソルボース、グロース、タロース、タガロース、ガラクトース、アロース、プシコース、アルトロース、およびショ糖を挙げることができる。

本発明においては、前述の多価アルコールおよび糖類から選ばれた1種以上を使用することができる。

また、本発明においては、グリセリン、エチレングリコールおよびショ糖から選ばれた1種以上であることが好ましい。

上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の使用割合は、気温23℃、相対湿度50%の環境下において、液体である場合は体積比で、粉体、粒体または固体である場合は重量比で、反応液全体に対する割合が5%以上、好ましくは15%以上であることが好ましい。

但し、該割合が5%未満であっても、併用する塩若しくは両性電解質の濃度を相対的に高めることにより、第2、第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。よって、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の反応液全体に対する割合（濃度）は、その種類に応じて、所望の効果を有効に発現できるように適当な濃度を適宜決定することが望ましく、かかる決定に際しては、併用する塩若しくは両性電解質の種類や濃度を考慮する必要がある。

本発明の製造方法に使用される塩もしくは両性電解質は、上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物との併用により、高pH領域でのアルカリ処理において蛋白の凝集・会合を起こさずに、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子のアン

ヒドロ化を促進し、第3工程において、高pH領域から中性付近にpHを戻す際に、凝集・会合を起こさずアンヒドロ化凝固因子を再生する目的で添加されるものであり、かかる目的に適した塩濃度（イオン強度）、誘電率が得られるならば特に制限されるものではない。

5 本発明に使用する塩または両性電解質としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等のハロゲン化アルカリ金属、塩化マグネシウム、塩化カルシウム等のハロゲン化アルカリ土類金属、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、炭酸アンモニウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カルシウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素アンモニウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二アンモニウム、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウムなどの無機酸塩、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、クエン酸マグネシウム、クエン酸カルシウム、クエン酸アンモニウム、フタル酸ナトリウム、フタル酸カリウム、フタル酸マグネシウム、フタル酸カルシウム、フタル酸アンモニウム、コハク酸ナトリウム、コハク酸カリウム、コハク酸マグネシウム、コハク酸カルシウム、コハク酸アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸カルシウム、酢酸マグネシウム、酢酸アンモニウム等の有機酸塩、グリシン、アラニン等の両性電解質となるアミノ酸などの水に可溶な塩もしくは両性電解質を挙げることができる。

本発明において前述の塩または両性電解質は、1種単独若しくは2種以上を混合して用いることができる。

前述の塩または両性電解質の中でも、低分子のアルカリ金属塩、無機塩類および両性電解質は、水に易溶で、併存する上記多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の濃度に応じて最適なイオン強度（塩濃度）、誘電率に容易に調整でき、さらに精製分離工程（例えば透析など）が容易（ないし簡略化できるもの）であることから、本発明の製造方法に好ましく使用することができる。

本発明の製造方法における塩もしくは両性電解質の反応液中の濃度は

、0.2 M以上、好ましくは0.5 M以上とすることが望ましい。ただし、当該濃度が0.2 M未満であっても、上述した多価アルコールおよび糖類よりなる群から選ばれてなる少なくとも1種の化合物の場合と同様に当該化合物の全体に対する割合を相対的に高めることにより、第2
5 ～第3工程を行うことは可能であり、所望の効果を有効に発現できる。

本発明のアンヒドロ化凝固因子は、上記以外の合成方法、例えば、反応阻害剤をPMSFに変えて反応工程中で塩酸グアニジン（Gdn-HCl）を用いる方法により合成することも可能である。

10 第2の発明は、第1の発明である活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質を、リガンドとして担体に固定した血液凝固因子吸着体である。

本発明の血液凝固因子吸着体が吸着する血液凝固因子は、反応抑制の対象となる活性化血液凝固因子の基質である。

15 一例を挙げて説明すれば、活性化血液凝固第X因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質を担体に固定した血液凝固因子吸着体であれば、吸着の対象となる物質は血液凝固第VIII因子となり、該血液凝固因子吸着体は、活性化血液凝固第X因子の分離、精製に使用することができる。

20 本発明の血液凝固因子吸着体に使用する担体としては、従来既知のものを使用することができ、具体的には、セルロース、アガロース、キトサン、およびビニルポリマーなどを挙げることができる。本発明に使用する担体の形状は特に限定されるものではないが、粒子であることが好ましく、更に、セルロースであることが好ましい。

25 また、該担体と該リガンドとの固定化の方法（反応）、固定化リガンドの濃度、使用するスペーサの種類などは、従来既知の技術を幅広く適用することができるものであり、これらの中から適宜選択して使用すればよい。

第3の発明は、第2の発明である血液凝固因子吸着体を用いる血液凝

固因子の精製方法である。

本発明は、該血液凝固因子を用いていれば、如何なる精製方法であってもよく、例えば、該血液凝固因子吸着体をカラムに充填し、このカラムに、目的物である血液凝固因子を含有する液体を、通すことによって、目的物である血液凝固因子とそれ以外の成分とを分離することができる。

その際の条件等については、血液凝固因子の種類、血液凝固因子を含有する液体の物性、性状等によって適宜選択すればよい。

(実施例)

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1

1) アンヒドロ活性化血液凝固第 X 因子の製造

ヒト血漿由来の活性化血液凝固第 X 因子 10.5 mg を、5 mM リン酸緩衝液 / 0.1 M NaCl / pH 6.5 10 ml に溶解した液に、7% フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) メタノール溶液 30 μ l を 30 分おきに総活性が 0.1% 未満になるまで添加した。

この溶液を 0°C に冷却し 1 M NaOH を 0.5 ml 添加し、12 時間反応させた。反応後 3 M NaCl 溶液を 5 ml 添加し、さらに 19 g のグリセリンを添加した。

この溶液を 1 M トリス塩酸緩衝液 pH 7 を用い pH を 8 に調整し、4°C で 12 時間放置し、その後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 1 M NaCl / pH 7.5 で 4°C で 12 時間透析した。さらにその後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1 M NaCl / pH 7.5 で 4°C で 12 時間透析した。残存活性を *p*-アミジノフェニル メタンサルホニルフルオリドを添加し 0.0001% 以下迄、不活性化処理をした。

この溶液をその後 50 mM トリス塩酸緩衝液 / 0.1 M NaCl / pH 7.5 で 4°C で平衡化したベンズアミジンセファロース 6B カラム 100 ml に添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後 50 mM トリ

ス塩酸緩衝液／0.1Mベンズアミジン／0.1M NaCl／pH 7.5で溶出した。

透析によりベンズアミジンを除去し、得られたアンヒドロ化凝固第IX因子約5mgを得た。

5

実施例 2

1) アンヒドロ活性化血液凝固第IX因子の製造

ヒト血漿由来の活性化血液凝固第IX因子8.5mgを、5mMリン酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 6.5 10mlに溶解した液に、7%フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) メタノール溶液30 μ lを30分おきに総活性が0.1%未満になるまで添加した。

この溶液を0℃に冷却し1M NaOHを0.5ml添加し、12分間反応させた。反応後3M NaCl溶液を5ml添加し、さらに19gのグリセリンを添加した。

この溶液を1Mトリス塩酸緩衝液pH 7を用いpHを8に調整し、4℃で12時間放置し、その後50mMトリス塩酸緩衝液／1M NaCl／pH 7.5で4℃で12時間透析した。さらにその後50mMトリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5で4℃で12時間透析した。残存活性をP-アミジノフェニル メタンサルホニルフルオリドを添加し0.0001%以下迄、不活性化処理をした。

この溶液をその後50mMトリス塩酸緩衝液／0.1M NaCl／pH 7.5で4℃で平衡化したベンズアミジンセファロース6Bカラム100mlに添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後50mMトリス塩酸緩衝液／0.1Mベンズアミジン／0.1M NaCl／pH 7.5で溶出した。

透析によりベンズアミジンを除去し、得られたアンヒドロ化凝固第IX因子約4mgを得た。

実施例 3

1) アンヒドロ活性化血液凝固第 V I I 因子の製造

ヒト血漿由来の活性化血液凝固第 V I I 因子 3. 1 m g を、5 m M リン酸緩衝液 / 0. 1 M N a C l / p H 6. 5 10 m l に溶解した液に、7 % フェニルメチルスルフォニルフルオリド (P M S F) メタノール溶液 30 μ l を 30 分おきに総活性が 0. 1 % 未満になるまで添加した。

この溶液を 0 °C に冷却し 1 M N a O H を 0. 5 m l 添加し、12 時間反応させた。反応後 3 M N a C l 溶液を 5 m l 添加し、さらに 19 g のグリセリンを添加した。

この溶液を 1 M トリス塩酸緩衝液 p H 7 を用い p H を 8 に調整し、4 °C で 12 時間放置し、その後 50 m M トリス塩酸緩衝液 / 1 M N a C l / p H 7. 5 で 4 °C で 12 時間透析した。さらにその後 50 m M トリス塩酸緩衝液 / 0. 1 M N a C l / p H 7. 5 で 4 °C で 12 時間透析した。残存活性を P- アミジノフェニル メタンサルホニルフルオリドを添加し 0. 0001 % 以下迄、不活性化処理をした。

この溶液をその後 50 m M トリス塩酸緩衝液 / 0. 1 M N a C l / p H 7. 5 で 4 °C で平衡化したベンズアミジンセファロース 6 B カラム 30 m l に添加し同緩衝液で完全に非吸着物を洗浄後 50 m M トリス塩酸緩衝液 / 0. 1 M ベンズアミジン / 0. 1 M N a C l / p H 7. 5 で溶出した。

透析によりベンズアミジンを除去し、得られたアンヒドロ化凝固第 V I I 因子約 1. 7 m g を得た。

25 産業上の利用可能性

第 1 の発明である、活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質を血栓形成予防薬として使用すれば、目的とす

る酵素活性のみを選択的に阻害することが可能である。

また、該物質は活性化血液凝固因子の活性を抑制することができることから、新機構の血栓形成予防薬として極めて有用であるだけでなく、発酵工業や、その他有用蛋白精製工程などの分野における酵素活性の制御において、有効に使用することができる。

本願第2の発明である血液凝固因子吸着体を、血液凝固因子の分離精製に用いれば、フィブリノーゲンや、異種タンパク質などの混入の可能性が極めて低い血液凝固因子を得ることが可能である。

請 求 の 範 囲

1. 活性化血液凝固因子の基質に、該活性化血液凝固因子と競争して結合することによって、該活性化血液凝固因子と該基質との反応を抑制する物質。

2. 前記物質が、活性化血液凝固因子の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる物質である請求項1に記載の物質。

3. 前記物質が、活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位がアンヒドロ化された物質である請求項1または2に記載の物質。

4. 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液凝固第X因子である請求項3に記載の物質。

5. 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液凝固第IX因子である請求項3に記載の物質。

6. 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子が、活性化血液凝固第VII因子である請求項3に記載の物質。

7. (1) 活性セリン残基を有する活性化血液凝固因子の活性セリン残基部位と合成阻害剤とを反応させる工程、

(2) pH11.0~13.5の範囲でアルカリ処理を行う工程、

(3) 回収操作を行う工程、

を含み、かつ前記工程を順次行い、少なくとも回収操作を行う工程において、多価アルコールおよび糖類よりなる群より選ばれた1種以上の化合物と、塩若しくは両性電解質を共存させることを特徴とする請求項1~6のいずれか1項に記載の物質の製造方法。

8. 請求項1~6のいずれか1項に記載の物質を担体に固定した血液凝固因子吸着体。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K 14/745, C07K 17/14

According to International Patent Classification (IPC) as to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K 14/745, C07K 17/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 92/15686, A1 (ZYMOGENETICS, INC.),	1-3, 6
Y	17 September, 1992 (17.09.92) (Family: none)	4, 5, 7, 8
Y	Teissere M. et al., "Purification and characterization of a fatty acyl-ester hydro from post-germinated sunflower seeds", Biochim. Biophys. Acta (1995), Vol.1255, No.2, pp.105-112	1-8
Y	Sugihara A. et al., "Purification and characterization of a carboxylesterase from Pseudomonas sp. KWI-56", Biosci. Biotechnol. Biochem (1994), Vol.58, No.4, pp.752-755	1-8
Y	Kinichiro MIURA, "Tanpakushitsu Kougaku", 1 st ed. Tetsugaku Shuppan K.K. (1998), pp.127-128	1-8
Y	Kenneth E. et al., "The conversion of serine at the active site of subtilisin to cysteine: a chemical mutation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1966), Vol.56, No.5, pp.1606-1611	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2000 (08.09.00)Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K 14/745, C07K 17/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K 14/745, C07K 17/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 92/15686, A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 17.9月.1992 (17.09.92) ファミリーなし	1-3, 6 4, 5, 7, 8
Y	Teissere M. et al., "Purification and characterization of a fatty acyl-ester hydro from post-germinated sunflower seeds", Biochim. Biophys. Acta (1995), Vol.1255, No.2, p.105-112	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sugihara A. et al., "Purification and characterization of a carboxylesterase form Pseudomonas sp. KWI-56", Biosic. Biotechnol. Biochem (1994), Vol. 58, No. 4, p. 752-755	1-8
Y	三浦 謹一郎, 大島泰郎, 渡辺公綱 編・著者, "タンパク質工学", 第1刷, 哲学出版株式会社, 1998, p. 127-128	1-8
Y	Kenneth E. et al., "The conversion of serine at the active site of subtilisin to cysteine : a chemical mutation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1966), Vol. 56, No. 5, p. 1606-1611	1-8